

buffer; the first one appearing with the void volume V_0 of the column (106 ml), the second, a considerably larger one, with an elution volume V_e of 140 ml (Figure 1a). Purified horse hemoglobin and myoglobin (Miles-Seravac),

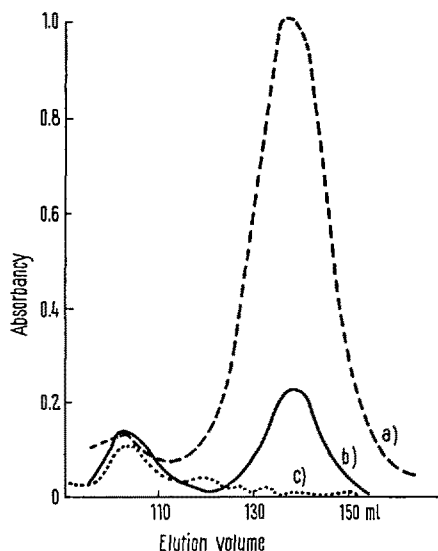


Fig. 1. Sephadex G-50 chromatography of the extracts from a) chicken gizzard (---); b) 'red' leg muscles (—); and c) 'white' pectoral muscle (.....).

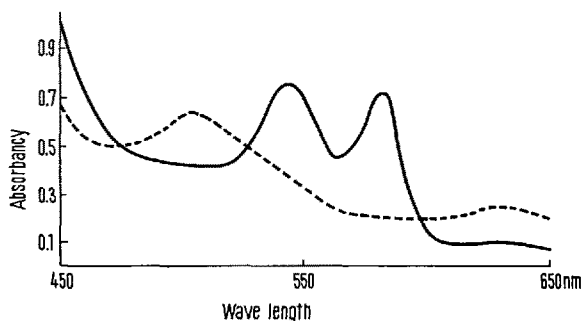


Fig. 2. The spectrophotometric tracing of chicken gizzard 'myoglobin' in the oxy- (—) and met- (---) form.

applied to the same column, were shown to give identical elution patterns. The absorption spectra of the second peak and its met-form (Figure 2) are almost identical with the absorption spectra reported for human myoglobins, e.g.⁷. We therefore conclude from these preliminary experiments that besides hemoglobin, chicken gizzard muscle contains a significantly impressive amount of myoglobin or myoglobin-like substance.

Control experiments, using other chicken tissue, showed that similarly prepared extracts from cardiac or 'red' leg muscle (Mm. adductor magnus and semimembranosus) contained both hemoglobin and myoglobin (Figure 1b); 'white' pectoral muscle hemoglobin and a trace of myoglobin (Figure 1c); whereas myoglobin was virtually absent when extracts from liver or oviduct were applied to the column.

We have recently prepared the myoglobin from gizzard smooth muscle in a quantitative scale for biochemical and immunological studies. These results will be presented shortly.

Zusammenfassung. In der glatten Muskulatur des Hühnermuskelmagens konnte ein wasserlösliches Hämoprotein nachgewiesen werden, das sich chromatographisch und spektrophotometrisch wie Myoglobin verhält.

UTE GRÖSCHEL-STEWART⁸,

URSULA JAROSCHIK and H. SCHWALM

Universitäts-Frauenklinik,
D-8700 Würzburg (Germany), 11 November 1970.

¹ L. J. KAGEN and R. GUREVICH, *Immunology* 12, 667 (1967).

² H. FASOLD, G. RIEDL and F. JAISLE, *Eur. J. Biochem.* 15, 122 (1970).

³ J. K. CHOI, Fifth Int. Conf. Electron Microsc., Philadelphia, M 9 (1962).

⁴ D. M. NEEDHAM and C. F. SHOENBERG, *Proc. R. Soc., Serie B* 160, 521 (1964).

⁵ M. BÁRÁNY, K. BÁRÁNY, E. GAETJENS and G. BAILIN, *Arch. Biochem. Biophys.* 113, 205 (1966).

⁶ C. F. SHOENBERG, *Tissue Cell* 1, 83 (1969).

⁷ G. B. THEIL, *Am. J. clin. Path.* 49, 190 (1968).

⁸ This work is supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Einbau von Schwefelwasserstoff in Verbindungen des Photosynthesestoffwechsels

In photosynthetisierenden Zellen entstehen unter der Einwirkung von Schwefelwasserstoff wasserlösliche Schwefelverbindungen¹. Eine Identifizierung gelang bisher nicht, da nur geringe Substanzmengen anfallen. Verschiedene Hinweise lassen jedoch vermuten, dass die Verbindungen als Derivate von Zwischenprodukten des zentralen und intermediären Stoffwechsels aufzufassen sind^{2,3}. In-vitro-Experimente erlaubten uns, eine Eintrittsstelle in den zentralen Stoffwechsel aufzufinden und die gebildete Verbindung zu identifizieren.

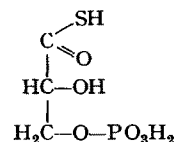
Zu diesem Zweck untersuchten wir die Carboxylierung des Ribulose-di-phosphats (Sigma, Chemical Company, St. Louis, USA) in Anwesenheit von $H^{14}CO_3^-$ und frisch zubereitetem $H^{35}S$ ⁻⁴. Vorversuche haben ergeben, dass die partiell gereinigte Spinatcarboxylase (Sigma) ohne Cofaktoren zur Carboxylierung imstande ist und die

verwendete Sulfidkonzentration die Reaktion nicht merklich beeinflusst. Dieser suboptimale Ansatz bezweckt, Artefakte mit dem reaktionsfreudigen Sulfid auf ein Minimum herabzusetzen. In den Hauptversuchen enthielt jeder Ansatz in 1 ml Lösung (pH 7,8) 0,1 Einheit Carboxylase, $2 \mu M$ Ribulose-di-phosphat, $10 \mu M HCO_3^-$ und $10 \mu M HS^-$, ausgenommen Ansatz No. 1. Die Ansätze 1–3 waren mit ^{14}C und die Ansätze 3–4 mit ^{35}S markiert. Im Anschluss an die 60minütige Inkubation der Reaktionsgemische erfolgte eine papierelektrophoretische Auftrennung der Produkte⁵. Mittels Autoradiographien wurden die einzelnen Verbindungen aufgesucht, anschließend eluiert, gesammelt und im IR-Spektrophotometer analysiert⁶.

Um Artefakte ganz auszuschliessen, wurden alle in Frage kommenden Kombinationen zwischen Edukten,

Produkten und Enzympräparat getestet. Anlagerungen von Sulfid an verschiedene Verbindungen sind aufgetreten. Sie beeinflussen aber die nachfolgenden Aussagen nicht. In der Figur sind die Resultate dargestellt. In

Anwesenheit von H^{35}S - wird eine Verbindung markiert, welche sich als Phosphorsäureester der Thioglycerinsäure herausstellte:

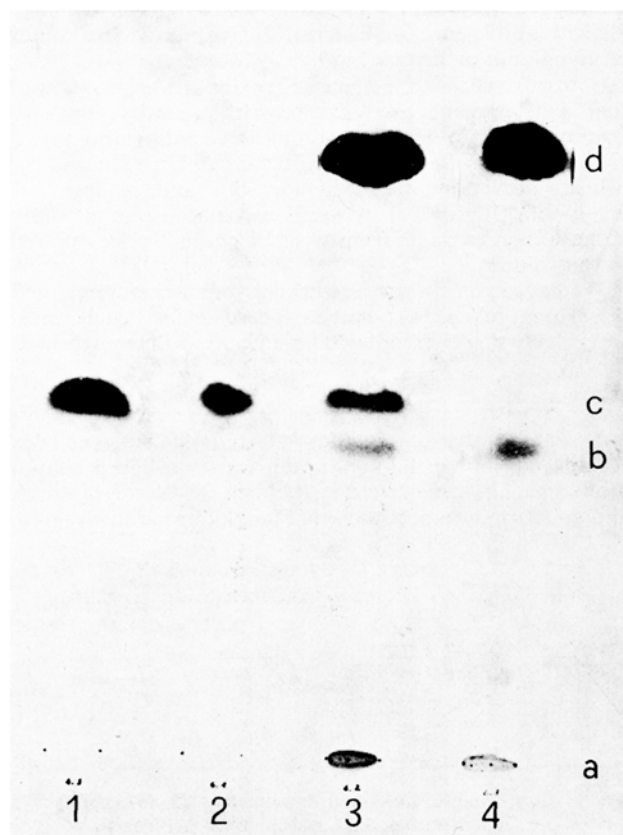


Die beiden Isotope werden getrennt in die zwei C_3 -Verbindungen eingebaut. Die Erklärung dazu liefert der Reaktionsmechanismus der Carboxylase⁷. Falls bei der Spaltung der äusserst unbeständigen C_6 -Verbindung H_2^{35}S die Funktion von H_2O übernimmt, entsteht neben einem ^{14}C -markierten Molekül Phosphoglycerinsäure ein ^{35}S -markiertes Molekül Phosphothioglycerinsäure. Die Carboxylase ist somit für die Synthese nicht direkt erforderlich, sondern lediglich für die Bereitstellung der instabilen C_6 -Verbindung⁸.

Summary. The presence of sulphide in the reaction mixture of the Ru-DP carboxylation leads to the synthesis of phospho-thioglyceric acid.

R. BRÄNDLE und J. MARTI

*Pflanzenphysiologisches Institut der Universität,
Allenbergstrasse 21, CH-3013 Bern (Schweiz),
6. Dezember 1970.*



Autoradiographie der Reaktionsprodukte. 1, 2, 3, 4 = verschiedene Ansätze (vgl. Text). a) Start; b) Phosphothioglycerinsäure; c) Phosphoglycerinsäure; d) anorganische Oxidationsprodukte des Schwefels.

¹ K. H. ERISMANN und R. BRÄNDLE, *Flora, Jena A* 159, 379 (1968).

² R. BRÄNDLE, R. STRASSER und K. H. ERISMANN, *Verh. schweiz. naturf. Ges.* 68, 122 (1968).

³ R. BRÄNDLE und J. SCHNYDER, *Experientia* 26, 1395 (1970).

⁴ C. M. JOHNSON, *Analyt. Chem.* 24, 736 (1952).

⁵ P. SCHÜRMANN, *J. Chromat.* 39, 507 (1969).

⁶ Der GRD, Wimmis, Schweiz, danken wir für die Aufnahme und Interpretation der IR-Spektren.

⁷ B. R. RABIN und P. W. TROWN, *Nature, Lond.* 202, 1290 (1964).

⁸ Die Arbeit wurde durch den Schweiz. Nationalfonds unterstützt.

Immunochemical Differentiation between Gastrin and Related Peptide Hormones through a Novel Conjugation of Peptides to Proteins

Gastrins from different mammalian species are all heptadecapeptide amides with amino-acid sequences varying in the central region¹⁻³. At the outset of the chemical work it was discovered that gastrin-like hormonal activity is possessed by any peptide containing the same four C-terminal residues as the gastrins, viz. Trp-Met-Asp-Phe-NH₂⁴. The same sequence has since been discovered as a structural component of other naturally occurring peptides^{5,6}, notably cholecystokinin-pancreozymin (CCK-PZ)⁷. There is a clear need for a sensitive technique of differentiating between gastrin and CCK-PZ in biological tissues. Several immunochemical assays have been developed for gastrin (e.g. refs.⁸⁻¹¹), but in their present form there is risk of cross reactivity with CCK-PZ. In this communication we describe a logical method of achieving the desired selectivity in immunochemical assay of gastrin.

The problem was approached with the aim of raising antibodies to that part of the gastrin molecule lacking the C-terminal tetrapeptide. The functional groups in this 1-13 sequence comprise several side-chain carboxyl

groups of glutamic acid and one phenolic group of tyrosine at position 12. The latter seemed to us to offer the best link for peptide-protein conjugates which would be specifically antigenic.

Halogenated-1,3,5-triazines are excellent reagents for attaching small molecules to macromolecules¹²⁻¹⁴, and they can be used successfully for coupling peptides, through their amino-groups, to proteins¹. 2,4-Dichloro-6-methoxy-1,3,5-triazine (I)¹⁵ reacts with the phenolic hydroxyl group of tyrosine residues in neutral solution at surprising speed, yielding the mono-chloro derivative (II)¹⁶. The remaining chlorine retains sufficient reactivity for convenient displacement by, for example, the side-chain amino-groups of a protein. Thus the conjugates (III) are accessible. Acidic hydrolysis of the conjugates and amino-acid analysis in the usual way reveal the new amino-acid (IV), which is eluted in the analyzer close to leucine¹⁷. Conjugation of (II) with proteins can be run at pH 8.5 (pH stat), but on a small scale it is convenient to use potassium bicarbonate to buffer both this stage and the initial formation of (II) from (I).